

## **OTKA T-037887 zárójelentés**

### **Az anti-apoptózis mechanizmus vizsgálata agyi ischaemia/hypoxia modellekben**

Az ischaemias stroke-ot követően az elzáródott ér ellátási területének centrumában percek, órák alatt nekrotikus jellegű sejtpusztulás alakul ki. A nekrotikus mag körül körül kialakuló héjszerű penumbra zónában a patofiziológiás folyamatok lassabban alakulnak ki. A bekövetkező komplex jelenségek része a késői sejtpusztulás, az apoptózis. A penumbra területen zajló apoptózis mechanizmusának feltárása és a folyamat megállítására irányuló módszerek kidolgozása ígéretes kutatási terület, mert így kiterjedt agyszövet pusztulást lehetne megelőzni.

Az apoptózis / antiapoptózis folyamatok mellett a penumbra területén olyan proteinek (GAP-43, synapsyn, nestin) is megjelennek illetve expressziójuk fokozódik, amelyek az új sejtkapcsolatok kialakításával a neuronális, szinaptikus plaszticitást fokozzák, és ezzel a poszt-ischaemias / hypoxias károsodások reparációjában játszanak fontos szerepet.

A kutatási programban célul tűztük ki

1. az agyi ischaemia pathomechanizmusának vizsgálatát, *in vitro* PC12 neuron sejtkultúrában és hippocampus organotipikus szelet kultúrában, valamint *in vivo* gerbil tranziens ischaemias modellben,
2. a legfontosabb mechanizmusok (differenciáció, apoptózis/anti-apoptózis, neuron plaszticitás) tanulmányozását,
3. gyógyszer-, gén- vagy hormon-alapú neuronprotekciónak vizsgálatát.

Eredményeinket a háromféle kezelési mód köré csoportosítva mutatjuk be:

1. gyógyszeralapú: (-)-deprenyl, BPAP,
2. antiapoptotikus Bcl-2 és Bcl-XL géneket hordozó adenovírus vektor alapú,
3. ösztrogén alapú.

#### **1. (-)-Deprenyl neuroprotektív hatásának vizsgálata PC12 neuron sejtkultúrában hypoxiás körülmények között**

A (-)-*deprenyl* (fenil-izopropil-metil-propargilin, selegilin) relatíve szelektív és irreverzibilis gátlója a monoamin oxidáz-B (MAO-B) enzimnek. Sikeresen alkalmazzák a Parkinson és az Alzheimer kór gyógyításában. Ismeretes az is, hogy a (-)-deprenyl direkt modulálja a mitokondriális transzmembrán potenciált és a reaktív oxigén gyökök termelődését. Bár

neuroprotektív hatásának mechanizmusa nem ismert pontosan, annyi bizonyosnak látszik, hogy ez a hatás független a MAO-B gátlástól. Munkánk során PC12 sejt kultúrában vizsgáltuk a (-)-deprenyl hatását hypoxia/reoxigenizációt követően.

### ***PC12 sejt kultúra***

Vizsgálatainkhoz PC12 patkány pheochromocytoma sejteket használtunk, melyek könnyen és jól szaporíthatóak, és idegsejt-növekedési faktor (NGF) hatására idegsejtekhez hasonló neuronális sejtekké differenciálódnak. A PC12 sejteket az American Type Culture Collection-tól szereztük be, majd glutamin és 15% szérumban tartalmú tenyésztő médiumban felszaporítottuk. A neuronális sejt differenciációt NGF-fel kiegészített alacsony szérumban tartalmú médiumban végeztük.

### ***Hypoxia/reoxigenizáció***

Kísérleteinkben az *in vitro* hypoxiát argon gáz használatával állítottuk elő. A hypoxiás kamrába behelyeztük a vizsgálni kívánt sejtenyészetet és a kamrát feltöltöttük argon gázzal. Egy óra hypoxia után a sejteket 24 óráig reoxigenáltuk 5% CO<sub>2</sub> és 95% levegő keverékében. A médium oldott oxigén tartalmát vér-gáz analizátorral mértük. Normoxiában 155-161 Hgmm értékeket mértünk, a hypoxia 50-56 Hgmm parciális oxigénnyomás értéket eredményezett. A használt argon gázos módszer standard hypoxiás sejt károsodás létrehozására alkalmas.

### ***Reaktív oxigén gyökök termelődésének és a mitokondriális membránpotenciál változásának együttes jelzése***

Munkánkhoz olyan új vizsgálati módszert vezettünk be, amellyel egyszerre tudtuk nyomon követni a hypoxiás inzultus hatására bekövetkező mitokondriális membránpotenciál változást és a felszabaduló reaktív oxigén gyökök (ROS) aktivitását. Ehhez két régóta ismert alkalmazást, a JC-1 festést és a cérium-klorid reflexiós mérést dolgoztuk át, egygá. A mitokondrium membránpotenciálját JC-1 fluoreszcens festékekkel jeleztük. A JC-1 monomerek szelektíven a mitokondriumban akkumulálódnak, majd a membrán potenciál következtében aggregálódnak. Alacsony membrán potenciál esetén kevés aggregált JC-1 forma detektálható. A JC-1 molekulák aggregált formája piros színnel jelzi a funkcióját megtartott mitokondriumokat, míg a JC-1 monomerek zöld színűek. A piros/zöld szín aránya jól jellemzi a mitokondriális membránpotenciál változást. A ROS detektálása igen nehéz, mert nagyon gyorsan reakcióba lépnek más molekulákkal. Cériummal történő reakciójuk stabil, oldhatatlan cérium-perhidroxid csapadék kialakulásához vezet. A JC-1 fluoreszcens szignált és a cérium-ROS precipitátumot konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltuk. Az új vizsgálati protokoll sejt szintű kvantitatív és kvalitatív meghatározásokat egyaránt lehetővé tesz, és alkalmas gyógyszerjelölt neuroprotektív molekulák tesztelésére.

### ***(-)-Deprenyl citoprotektív hatása PC12 sejt kultúrában hypoxiás körülmények között***

A (-)-deprenyl hatását PC12 sejt kultúrában vizsgáltuk. A PC12 sejteket 1 óráig argongázos hypoxiában inkubáltuk, majd a hypoxiát követően 24 órás reoxigenizációt alkalmaztunk. A reoxigenizáció során a sejteket (-)-deprenyillel kezeltük különböző koncentrációban, majd propidium jodiddal vizsgáltuk a sejtek életképességét, a mitokondriális membránpotenciál változását és a ROS mennyiségét. A hypoxia hatására a propidium jodid pozitív elpusztult sejtek aránya 2-szeresére emelkedett a normoxiás kontrollhoz képest. A JC-1 jelölt piros/zöld arány csökkent közel a felére, a ROS mennyisége emelkedett. (-)-Deprenyl jelenlétében a propidium jodid pozitív sejtek aránya szignifikánsan csökkent a hypoxiás kontrollhoz képest, a JC-1 piros/zöld arány 3-4-szeresre emelkedett, a ROS mennyisége szignifikánsan csökkent. A (-)-deprenyl hatása  $10^{-8}$ - $10^{-12}$  mól/L koncentráció tartományban volt a legszámottevőbb,  $10^{-3}$  mól/L koncentrációban már sejtpusztulást okozott.

### ***(-)-Deprenyl hatása a Bcl-2, SOD1 és GAP-43 fehérjék expressziójára PC12 sejt kultúrában***

A citoprotektív vizsgálatokat követően (-)-deprenyl hatását egyes antiapoptotikus fehérjék (Bcl-2, SOD1) és a neuronális plaszticitás fehérje, a growth-associated protein-43 (GAP-43) expressziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az 1 óra hypoxia/24 óra reoxigenizáció után a Bcl-2, SOD1 és GAP-43 fehérjéket Western slot-blot analízissel mutattuk ki, a (-)-deprenylt  $10^{-8}$  mól/L koncentrációban alkalmaztuk. A hypoxia hatására mind a három vizsgált fehérje expressziója csökkent a normoxiás kontrollhoz képest. A (-)-deprenyl kezelésre a Bcl-2, SOD1 és GAP-43 fehérje expresszió emelkedett a hypoxiában mért értékekhez képest. Ha a PC12 sejteket a I $\kappa$ B $\alpha$  specifikus inhibitorral, a Bay 11-7082-vel kezeltük, az inhibitor eliminálta a (-)-deprenyl Bcl-2, SOD1 és GAP-43 fehérjék expressziójára gyakorolt hatását.

### ***Oxigén és glükóz megvonás hatására indukálódó változások a patkány hippocampus organotipikus tenyésztésében. (-)-Deprenyl hatásának vizsgálata.***

(Az MTA KOKI Molekuláris Neuroendokrinológiai Kutatócsoportjában végzett kutatások keretében végzett munka eredményei.)

Kutatócsoportunkban módszert fejlesztettünk a patkány hippocampus organotipikus "explant" tenyésztésben való fenntartására. Az 5-7 napos patkány hippocampusából készített szeleteket definiált médiumban tenyésztjük *in vitro* 3-4 hétig. A szelettenyésztésben a neuron és glia sejtek jelentős számban vannak jelen, amit MAP-2 és GFAP immunfestéssel karakterizáltunk. Az organotipikus kultúrák citoarchitektúráját fény- és elektromikroszkópos szinten jellemeztük. A patkány hippocampus szelettenyésztéseit kidolgoztuk az ischémiás

agykárosodás in vitro modelljét, oxigén és glukóz együttes megvonásával (OGD). Propidium jodid felvétel alapján időben követtük az OGD által indukált sejtpusztulást.

A (-)-deprenyl ischemia védő hatását in vitro vizsgáltuk a patkány hippocampusából készített organotipikus szelettenyészeteken.

A szelettenyészeteket 45 percig oxigén és glukóz mentes körülmények között (OGD) inkubáltuk és a sejtpusztulás időbeni alakulását propidium jodid felvétellel követtük. A neuronális pusztulás első jeleit 2 órával az OGD után tapasztaltuk, mely 24 órával az ischemia után a hippocampus összes rétegére kiterjedt. A deprenyl kezelés ( $10^{-9}$ M) szignifikánsan késleltette az OGD által indukált sejtpusztulást.

RT-PCR módszerrel mértük az apoptózisban szereplő pro-apoptotikus Bax gén és az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-XL gének expresszióját. Kontroll szelettenyészeteken mind a három gén bazális expresszióját kimutattuk. Az OGD kezelést követően 24 órával a Bcl-2 gén expressziója közel 3-szorosára emelkedett a normoxiás kontrollhoz képest, ugyanakkor a Bcl-XL expresszió nem változott. A Bax gén expresszió szintén növekedett az OGD hatására, de ez a változás nem érte el a szignifikancia szintjét. A (-)-deprenyl kezelés a kontroll szelettenyészeteken nem-szignifikánsan emelte a Bcl-2 és a Bax gének szintjét. Az OGD alatti (-)-deprenyl kezelés nem okozott szignifikáns változást a vizsgált gének expressziójában.

### **A kutatási témához kapcsolódó egyéb gyógyszeralapú vizsgálatok**

#### ***A (-)-deprenyl és a (-)-BPAP cytoprotektív hatása human agyi endothelsejteken és PC12 sejteken***

A (-)-deprenylt és az (-)-1-(benzofurán-2-il)-2-propilaminopentánt ((-)-BPAP) széles koncentrációtartományban,  $10^{-14}$  –  $10^{-4}$  mól/L, human agyi endothelsejteken (HBEC) és PC12 sejteken, normoxiás illetve hypoxiás körülmények között. A HBEC illetve PC12 kultúrákat egy órán át argon gáz hypoxiában tartottuk, majd reoxigenáltuk különböző koncentrációjú (-)-deprenyl illetve (-)-BPAP jelenlétében. A (-)-deprenyl és a (-)-BPAP citoprotektív hatását propidiumjodid festéssel, és a sejtek metabolikus aktivitását jelző alamar blue kolorimetriás teszttel vizsgáltuk. Mindkét vegyület mindkét sejt kultúrában cytoprotektívnek bizonyult. A hatás kettős volt,  $10^{-14}$  –  $10^{-15}$  mól/L és  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  mól/L koncentrációknál erős szignifikancia mutatkozott.

#### ***Talampanel neuroprotektív hatása egér tranziens fokális ischaemia modellben***

A talampanel egy nem-kompetitív AMPA antagonist, mely különböző stroke modellekben neuroprotektívnek bizonyult.

Egérben egy órás átmeneti arteria cerebri media okklúzióval fokális agyi ischaemiát indukáltunk, amit 48 órás reperfúzió és talampanel kezelés követett. Vizsgáltuk az infarktus méretét, és az apoptózis/nekrózis mértékét TUNEL/kaspáz-3 kettős festéssel tettük láthatóvá. A talampanel kezelés hatására az infarktusos terület mérete szignifikánsan csökkent a kezeletlen kontrollokhoz képest. Az ischaemias lézió határára lokalizálódó TUNEL-pozitív sejtek száma csökkent a talampanel kezelésre, és szignifikánsan csökkent a kaspáz-3 aktív sejtek száma is. A talampanel szignifikáns neuroprotekciót és anti-apoptotikus hatást mutatott a használt ischaemiás modellben.

## **2. Antiapoptotikus géneket hordozó vírus vektorok vizsgálata PC12 neuron sejt kultúrában hypoxiás körülmények között**

Az adenovírus alapú vektorok jól használhatók olyan esetekben, amikor egy adott gén terméknek a rövidtávú expressziója a cél, mint például az ischaemiás állapotok kezelésére antiapoptotikus gének időleges overexpresszálása. A terápiás gént tartalmazó adenovírus vektorok a célsejtekben extrakromoszómális DNS-ként expresszálják a terápiás gént, tehát nem integrálódnak a genomba, így csak ideiglenes génbevitelre alkalmasak, ami ideális a postischaemiás károsodások kivédésére.

Munkánk során adenovírus vektorral bevitt Bcl-2 és Bcl-XL antiapoptotikus gének hatását vizsgáltuk *in vitro* PC12 neuron sejt kultúra modellben normoxiás körülmények között és hypoxia/reoxigenizációt követően.

### ***Vírus vektorok***

Az adenovírus vektor polyA gént,  $\beta$ -galaktozidáz (LacZ) repórter gént és az antiapoptotikus géneket (Bcl-2 vagy Bcl-XL) tartalmazza. A géneket egy cytomegalovírus promotor és csirke  $\beta$ -aktin promotor szabályozza. Az adenovírus E1 onkogénjei hiányoznak, ezért a vírus vektor képtelen emlős sejtekben önállóan szaporodni. Az E1 gének helyén a repórter gén és a terápiás gének helyezkednek el. A kísérletekben használt vírus koncentráció 10-200 PFU/sejt.

### ***A vírus vektor felvétele és eloszlása***

A neuronális növekedési faktorral differenciált PC12 sejteken, normoxiás körülmények között 80-200 PFU/sejt víruskoncentráció tartományban szinte valamennyi sejt felvette az adenovírus vektort. A vírus felvétel X-gal festéssel a repórter génként alkalmazott  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás alapján látható. Az adenovírus jelenléte még 10 nappal a transzfekciót követően is kimutatható volt.

### ***Bcl-2 és Bcl-XL fehérje expresszió a vírus vektor beadását követően***

A Bcl-2 és Bcl-XL vírus vektorral (100 PFU/sejt víruskoncentráció) kezelt PC12 sejteken normoxiás és hypoxiás körülmények között immuncitokémiával és Western blottal fehérje expresszió emelkedést mutattunk ki. A Bcl-2 fehérje mennyisége a Bcl-2 gén transzfekciót követően normoxiában 10-szeresére, míg 1 órás argon gáz hypoxiát és 24 óra reoxigenizációt követően 12-szeresére emelkedett a normoxiás kontrollhoz képest. A Bcl-XL gén bevitelével mellett expresszáldott Bcl-XL fehérje normoxiában illetve hypoxiában 2-3-szorosára emelkedett.

### ***Bcl-2 és Bcl-XL cytoprotektív hatása***

Az apoptotikus és nekrotikus sejtpopulációk arányát annexinV – propidium jodid kettősfestéssel vizsgáltuk. A PC12 sejteken 1 óra hypoxiát és 24 óra reoxigenizációt követően az apoptotikus sejtek aránya emelkedett a normoxiás kontrollhoz képest ( $39 \pm 2\%$  a  $8 \pm 1\%$ -hoz képest), amelyet az adenovírus alapú Bcl-2 illetve Bcl-XL gén transzfekció kivédi (Bcl-2 kezelés után az apoptotikus sejtek aránya  $5 \pm 2\%$ , Bcl-XL bevitel után  $9 \pm 1\%$ ). A nekrozis sem hypoxia sem gén bevitel után nem jelentős. Mindkét vírus vektor cytoprotektív hatása dózis-függő 10-120 PFU/sejt víruskoncentráció tartományban. 200 PFU/sejt koncentráció mellett mindkét vírus vektor toxikus a PC12 sejtre: az apoptotikus sejtek aránya  $14 \pm 2\%$ -ra nő, a nekrotikus sejtek aránya  $12 \pm 1\%$ -ra.

A cytoprotektív hatás idő-függő is. A Bcl-2 tartalmú vektor a hypoxiát követően már 4 óra reoxigenizáció után az apoptózist 50%-kal, míg 24 és 48 óra elteltével 80-90%-kal csökkenti a nem kezelt hypoxiás kontrollhoz képest. A Bcl-XL gén bevitelét követően a Bcl-2-nél tapasztalt hatás lassabban következik be (24-48 óra).

A hypoxia hatására szignifikánsan csökken a tetrametil-rhodamin-etilészter (TMRE) fluoreszcens szignál intenzitása a sejtekben ( $89 \pm 5$ , szemben a  $161 \pm 5$  jelintenzitás a normoxiás sejtekben), amely a mitokondrium membránpotenciál (MMP) csökkenését jelzi. A Bcl-2-t és Bcl-XL-t tartalmazó vírus vektorok az MMP hypoxiára történő csökkenését megakadályozzák.

### ***GAP-43 plaszticitás protein expressziója a Bcl-2 illetve Bcl-XL génbevitelt követően***

A GAP-43 plaszticitás protein expresszióját a PC12 sejteken immuncitokémiával követtük nyomon.

A GAP-43 (growth associated protein-43) plaszticitás protein expresszióját normoxiás körülmények között csak a Bcl-2 gén tartalmú vírus vektor növelte meg, 1,5-szeresre a kezeletlen kontrollhoz képest. Hypoxiát követően a Bcl-2 illetve a Bcl-XL génbevitel hatására a GAP-43 fehérje mennyisége 2-3-szorosára emelkedett a normoxiás kontrollhoz képest.

### ***Proapoptotikus, antiapoptotikus és plaszticitás gének vizsgálata Bcl-2 illetve Bcl-XL génbevitelt követően***

A Bcl-2 és Bcl-XL gént tartalmazó vektorok cytoprotektív hatására utaló eredményeinket követően további vizsgálatokat folytattunk a vektorokkal.

A PC12 hypoxiás sejtmódelben a vírus vektorok hatását génexpresszió szintjén vizsgáltuk: a proapoptotikus Bax génre, az antiapoptotikus Bcl-2 és Bcl-XL génekre és a synapsin-1, nestin és c-fos plaszticitás génekre. A PC12 sejtekből ABI 6100-as nukleinsav izoláló automata segítségével totál RNS-t izoláltunk. A reverz transzkripció során high capacity cDNA Kit segítségével az egységesen 1 µg RNS-t random hexamerrel cDNS-é alakítottuk át. Az egyes gének expresszióját TaqMan gén expressziós assay-vel real-time PCR segítségével detektáltuk, majd a kapott értékeket a ddCT képlet segítségével kvantifikáltuk. A mérések során endogén kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk.

Az 1 órás hypoxia / 24 órás reoxigenizációt követően a sejtek proapoptotikus Bax gén expressziója nőtt, míg a plaszticitás gének mRNS szintje csökkent. A Bcl-2 illetve a Bcl-XL gént tartalmazó vírus vektor bevitele hypoxiás körülmények között szignifikánsan növelte a Bcl-2, Bcl-XL, synapsin-1, nestin és c-fos mRNS expresszió szintjét.

### **3. Nagydózisú ösztrogénterápia hatása az agyi plaszticitásra gerbil módelben**

Az ösztrogén neuroprotektív szerepe jól ismert. Ismeretes, hogy az akut neurológiai sérülés patofiziológiáját és a rehabilitáció kimenetét szoros összefüggésbe hozzák a beteg nemével. A stroke állatmódeljeiben, valamint *in vitro* neuronális módellekben kimutatták az ösztrogén antiapoptotikus hatását. Patkány permanens arteria cerebri media okklúziós módelben az ösztradiol  $\beta$  típusú receptorán keresztül növelte a Bcl-2 expresszióját és csökkentette a neuronok apoptózisát. Tehát az ösztrogén neuroprotektív hatásáról rendelkezésre állnak adatok, de hatása nem tisztázott a repair funkciókra ischaemias stroke-ot követően.

Munkánk során az ösztrogénnek az agyi plaszticitásra kifejtett hatására koncentráltunk, a funkcionális kimenetel mellett vizsgáltuk az agyi plaszticitás gének expresszióját és szövettani vizsgálatokat végeztünk.

#### ***Gerbil tranziens globális ischaemia módel***

A műtéteket 3 hónapos nőstény mongóliai ugróegéren (mongolian gerbil), 2 héttel az ovariectomia után végeztük. Három állatcsoportot vizsgáltunk:

1. 10 perces tranziens globális ischaemia
2. 10 perces tranziens globális ischaemia + 4 mg/ testsúly kg ösztradiol i.p. előkezelés
3. sham operáció.

A tranziens ischaemiát halothan narkózisban, medialis nyaki feltárásból végeztük kétoldali carotis lefogással. Az állatok egy részéből a postoperatív 4. napon agykivétel történt szövettani (n=12) és molekuláris biológiai feldolgozás (n=10) céljából.

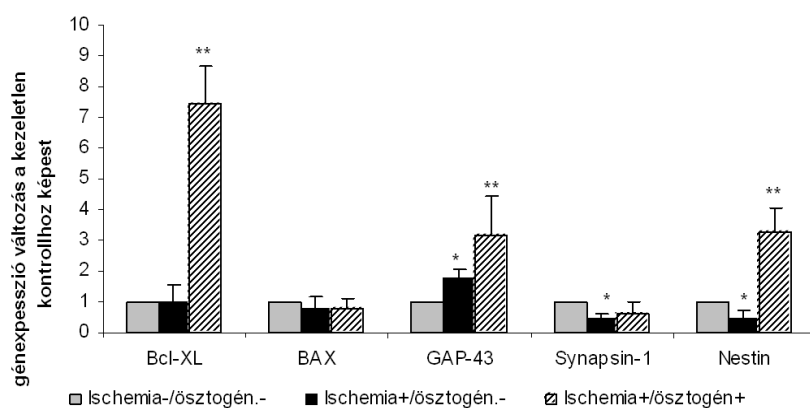
### ***Apoptózis / nekrozis vizsgálata***

A hippocampus CA1 régiójában a globális ischaemia hatására létrejövő apoptózist és nekrozist TUNNEL-caspase kettős festéssel vizsgáltuk. A szövettani vizsgálathoz paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A hippocampus CA1 régiójában az ösztrogén hatására szignifikánsan csökkent az apoptotikus és nekrotikus sejtek száma.

### ***Apoptózis és agyi plaszticitás gének expressziója***

Vizsgáltuk, hogy a globális tranziens ischemia valamint az ösztrogén kezelés hogyan változtatja meg a hippocampusban az apoptózisban és az agyi plaszticitásban szerepet játszó egyes gének expresszióját.

Nem fixált agyból – a hippocampus területéről- nyert marker mRNS szintet real-time PCR-ral határoztuk meg TaqMan gene expression assay-t használva, ddCT metodikával. A vizsgált gének: Bcl-XL, Bax, GAP-43, synapsin-1, nestin. Az ischaemiát követő 4. napon az agyi plaszticitásban szerepet játszó synapsin-1 és a nestin mRNS szintje szignifikánsan csökkent, a GAP-43 génexpresszió szignifikánsan nőtt, míg az antiapoptotikus Bcl-XL mRNS szintje nem változik. Az ösztrogén kezelt állatokban a Bcl-XL, a GAP-43 és a nestin gének expressziója szignifikánsan emelkedett a nem kezelt (kontroll) állatokhoz viszonyítva (1.ábra).



1. ábra: A Bcl-XL, BAX, GAP-43, Synapsin-1 és Nestin gének expressziójának változása a nem kezelt (ischemia-/ösztrogén-) mintához viszonyítva. Az adatok négy különböző mérés átlagát  $\pm$ szórást mutatnak. A szignifikancia szinteket t-próbával számoltuk ki (\*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ ).



### ***Viselkedés vizsgálatok***

Az állatok egy másik csoportján (n=20) a 7. posztoperatív naptól kezdve különböző viselkedésvizsgálatokat (spontán alternáció, novel object recognition, hole board) végeztünk, amelyben az állatok figyelmét és memóriáját vizsgáltuk. Az általunk vizsgált modellben az ischaemia szignifikánsan rontotta az állatok figyelmét és memóriaképességét az összes tesztben, ösztrogén hatására azonban a kontrollokéhoz hasonló eredményeket kaptunk.

### **Az eredmények összefoglalása**

**1. A (-)-deprenyl cytoprotektív-neuroprotektív hatását** vizsgáltuk hypoxiás körülmények között PC12 neuronális sejt kultúra modellben és patkány hippocampus organotipikus tenyészetében.

Munkánkhoz **új vizsgálati módszert** fejlesztettünk ki, amellyel egyszerre tudtuk nyomon követni a hypoxiás inzultus hatására bekövetkező mitokondriális membránpotenciál változást és a felszabaduló reaktív oxigén gyökök (ROS) aktivitását.

A (-)-deprenyl dózis-függő módon megvédi a PC12 sejteket a hypoxia/reoxigenizáció káros hatásától, a normoxiában tapasztalható szintre csökkenti az elpusztult sejtek arányát, fenntartja a mitokondriális membránpotenciált és kivédi a reaktív oxigén gyökök mennyiségének emelkedését.

A (-)-deprenyl fokozza az antiapoptotikus Bcl-2, SOD1 proteinek és a GAP-43 plaszticitás protein expresszióját, ezáltal csökkentve a hypoxiás inzultus káros következményeit. A (-)-deprenyl ezt a hatását feltehetően az NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  transzkripció útján keresztül fejti ki.

A (-)-deprenyl neuron védő hatásának bizonyult az *in vitro* organotipikus ischemia modellben is. Bár a (-)-deprenyl kontroll körülmények közt fokozza a Bcl-2 expresszióját, ezen antiapoptotikus hatása nem mutatkozik szignifikánsan oxigén-glükóz megvonás után.

Használt modelljeinkben tehát a (-)-deprenyl cytoprotektív – neuroprotektív hatásának bizonyult.

**2. Az antiapoptotikus Bcl-2 illetve Bcl-XL géneket hordozó adenovírus vektorokat** PC12 neuronális sejt kultúra modellben vizsgáltuk ischaemias körülmények között. A bevitt Bcl-2 és Bcl-XL gén konstruktok cytoprotektív hatásúak: a sejtek apoptózist szignifikánsan csökkentik, védik a mitokondriumot, illetve emelik a sejtek túléléséért felelős GAP-43 fehérje expresszióját. A Bcl-2 és Bcl-XL gén konstruktok aktiválják az ischaemias inzultust

csökkenteni tudó repair gének expresszióját, hatásukra hypoxiás körülmények között szignifikánsan emelkedett a Bcl-2, Bcl-XL, synapsin-1, nestin és c-fos mRNS expresszió.

**3. A nagy dózisú ösztrogénterápia hatását az agyi plaszticitásra gerbil modellben** vizsgáltuk.

A gerbil tranziens globális ischaemia modellben a nagy dózisú ösztrogén terápia hatására az érintett hippocampus A1 régióban csökken az apoptózis és a nekrosis mértéke, emelkedik az apoptózisban és az agyi plaszticitásban szerepet játszó egyes gének (Bcl-XL, nestin és GAP-43 ) expressziója, és javul az állatok teljesítménye a figyelmet és memóriát vizsgáló viselkedési tesztekben. Tehát az ösztrogén kezelés mind a repair mechanizmusokban szerepet játszó gének szintjén, mind a funkcionális tesztekben hatásosnak bizonyult.